

李博,高丽娟,于磊,等. *Marcks11* 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 108-114.
Li B, Gao LJ, YU L, et al. Establishment of *Marcks11* gene knockout mice and preliminary analysis of a hematopoietic phenotype [J].
Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 108-114.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.05.018

Marcks11 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析

李 博^{1,2},高丽娟^{1,2},于 磊^{1,2},张 旭^{1,2},李争光^{1,2},刘 宁^{1,2},史旭东^{1,2},
高 凯^{1,2},李 静^{1,2},高 珊^{1,2},齐晓龙^{1,2},张连峰^{1,2},马元武^{1,2*}

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021; 2.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立 *Marcks11* 基因敲除小鼠,初步探究该基因缺失对造血系统发育的影响。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Marcks11* 基因敲除小鼠,通过 PCR 技术以及 Sanger 测序方法鉴定小鼠基因型。通过将敲除小鼠与野生型小鼠杂交,分析敲除小鼠的传代情况。通过杂合子小鼠相互杂交,分析发育不同阶段纯合子、杂合子和野生型小鼠的占比。分离小鼠胎肝,利用血常规以及流式细胞术分析该基因缺失对造血系统的影响。**结果** PCR 结合 Sanger 测序结果表明 *Marcks11* 基因敲除小鼠构建成功。对不同阶段胚胎小鼠基因型鉴定和数量统计,发现小鼠 *Marcks11* 基因敲除造成的胚胎死亡发生于胚胎发育后期。通过血常规与流式细胞分析,结果表明 *Marcks11* 基因缺失在 E15.5 d 时不影响白细胞,红细胞以及血小板数量,但胎肝中造血干细胞比例显著增多。**结论** 本研究成功建立 *Marcks11* 基因敲除小鼠,并发现该基因缺失影响造血干细胞占比。本研究为进一步了解该基因在胚胎发育和造血系统中的功能提供动物模型。

【关键词】 *Marcks11*; 敲除小鼠; 造血干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0108-07

Establishment of *Marcks11* gene knockout mice and preliminary analysis of a hematopoietic phenotype

LI Bo^{1,2}, GAO Lijuan^{1,2}, YU Lei^{1,2}, ZHANG Xu^{1,2}, LI Zhengguang^{1,2}, LIU Ning^{1,2}, SHI Xudong^{1,2},
GAO Ka^{1,2}, LI Jing^{1,2}, GAO Shan^{1,2}, QI Xiaolong^{1,2}, ZHANG Lianfeng^{1,2}, MA Yuanwu^{1,2*}

(1. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China.
2. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To generate myristoylated alanine-rich C-kinase substrate-like 1c (*Marcks11*) gene knockout mice and investigate the gene function in hematopoiesis. **Methods** We used CRISPR/Cas9 technology to produce *Marcks11* gene knockout mice, which was confirmed by PCR and Sanger sequencing. Germline transmission of

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-3-015)。

[作者简介] 李博(1995—), 硕士, 研究方向: 疾病基因工程动物模型建立与造血干细胞功能研究。E-mail: libo0916@yeah.net

[通信作者] 马元武(1983—), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 疾病基因工程动物模型建立与组织干细胞衰老研究。

E-mail: mayuanwu@cnilas.org

Marcks1 gene knockout mice was confirmed by crossing to wild-type mice. We also analyzed the ratio of homozygous, heterozygous, and wild-type mice at different stages of embryonic development. We isolated mice fetal liver to examine the effect of *Marcks1* deletion on the hematopoietic system using routine blood and flow cytometry method. **Results** PCR and sequencing data showed that *Marcks1* knockout mice were successfully obtained. Our data further suggest that embryonic lethality caused by *Marcks1* gene knockout occurs at a late period of embryonic development. Routine blood and flow cytometry result showed that at E15.5, deletion of the *Marcks1* gene did not affect the number of white blood cells, red blood cells, or platelets, but the proportion of hematopoietic stem cells in fetal liver increased significantly. **Conclusions** We have successfully constructed a *Marcks1* knockout mouse. We further found that *Marcks1* deletion increased the number of hematopoietic stem cells. Our work provides a mouse model for further study of the gene function of *Marcks1* in embryonic development and the hematopoietic system.

【Keywords】 *Marcks1*; knockout mice; hematopoietic stem cell

血液是生命的动力源泉,造血伴随整个生命进程,造血系统发育包括原始造血和定向造血两个阶段^[1]。胚胎发育的第 7 天(E7 d),小鼠原始造血发生于卵黄囊的血岛,产生原始的有核红细胞及髓系祖细胞。定向造血最早出现于主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区,在胚胎发育的 E11.5 d 造血干细胞在 AGM 区生成^[2]。E12.5 d 时,造血干细胞从 AGM 区通过血液循环到达小鼠胎肝并迅速增殖。E15.5 d 时造血干细胞从胎肝向脾中迁移,同时胎肝中的造血干细胞逐渐减少^[3]。E17.5 d 时造血干细胞从脾向骨髓中迁移并最终定居于骨髓^[4]。整个胚胎期造血干细胞的发生、迁移和成熟涉及多个组织器官,这些组织器官对造血系统发育至关重要,造血发育调控已成为研究者的探究重点和热点内容。造血系统发育是一个精细且复杂的调控过程,涉及一系列的调控因子包括 TGF- β 、BMP4、Notch1、RUNX1 和 GATA2 等。研究表明 TGF- β 的表达损伤会影响小鼠卵黄囊的血管生成并导致造血功能缺陷^[5-6]。Dzierzak 和 Speck 在 2009 年证实 RUNX1 和 GATA2 调控内皮细胞向造血细胞的转化过程,从而影响造血干祖细胞的生成以及存活^[7-8]。另外一项研究则表明 WNT 通路对 AGM 中内皮细胞向造血干细胞的转化以及造血干细胞的生成至关重要^[9]。尽管目前对小鼠造血过程已有较深入的了解,但是由于造血过程的复杂性,真正了解完整的造血过程仍有很长的路要走。寻找新的造血干细胞发育的关键调控因子,对于进一步了解造血发育过程和治疗血液系统疾病具有重要意义。

豆蔻酰化的富含丙氨酸 C 激酶底物蛋白 1 (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate like 1, MARCKSL1), 属于 MARCKS 家族成员,又称为

MARCKS 相关蛋白(MRP), MARCKS 样蛋白(MLP) 和脑蛋白 F52^[10]。MARCKS 家族蛋白包括 MARCKS 和 MARCKSL1 两个家族成员,其包含三个保守的功能域:(1) MARCKS 同源结构域 2 (MARCKS Homology 2, MH2) 域;(2) N 末端结构域,该结构域可以进行可逆的豆蔻酰化;(3) 效应结构域(effector domain, ED),富含带正电荷的氨基酸残基,易于被蛋白激酶 C(PKC)或其他蛋白激酶磷酸化^[11]。MARCKSL1 在被蛋白激酶磷酸化后,从细胞质侧膜转移到细胞质中,参与调控细胞侵袭和迁移,血管运输以及各种信号转导等多种生理活动^[12-13]。已有研究表明, MARCKSL1 在整合素激活、大脑发育、细胞粘附调控、细胞吞噬、粘蛋白分泌、有丝分裂以及血管生成等活动中发挥作用^[14-16]。并且, MARCKSL1 缺失会造成小鼠神经管闭合缺陷^[17]。目前,尚未发现 *Marcks1* 在造血系统发育中的功能和作用。

在前期工作中,我们发现 *Marcks1* 基因在造血干细胞中高表达,并且在老年小鼠的造血干细胞中表达显著升高,提示其可能在造血干细胞发育过程发挥重要作用。为研究该基因在造血干细胞中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 系统建立了 *Marcks1* 基因敲除小鼠,并通过对其进行初步分析,发现该基因缺失造成的小鼠胚胎致死发生在胚胎发育后期。随后通过对小鼠胚胎期造血干细胞进行流式分析,发现 *Marcks1* 缺失影响造血干细胞的占比。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验中使用 SPF 级, C57BL/6 品系小鼠,均为 2~3 月龄,体重为 20~30 g,雌雄各 10 只。C57BL/6 小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司

[SCXK(京)2020-0004],饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF 级动物房[SYXK(京)2019-0011],同时动物饲养间采用 12 h 交替明暗照明,动物自由饮水进食。实验过程中严格遵循了 3R 原则,且涉及的动物相关实验均得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用及管理委员会(IACUC)的批准(ILAS-MYW20005)。

1.2 主要试剂与仪器

单链 DNA 片段(北京天一辉远生物科技有限公司);DNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);琼脂糖粉(Biowest Agarose 公司);MEGAshortscript T7 转录试剂盒(AM1354, Ambion, 美国);Lin 流式抗体(BD, 美国);Sca1(BD, 美国);c-kit(BD, 美国);流式细胞仪(BD, 美国);高速离心机(Eppendorf, 德国);PCR 扩增仪(Bio-Rad, 美国);PCR 仪(伯乐, 美国);Micro-PET/CT 扫描仪(Inveon, Siemens, Berlin, 德国);数码凝胶成像处理系统(天能, 中国);全血分析仪(Siemens, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备 *Marcks11* 基因敲除小鼠

利用本实验室建立的 CRISPR/Cas9 基因编辑平台,建立 *Marcks11* 基因敲除小鼠。针对 *Marcks11* 基因我们设计了两个 sgRNA 靶点(靶点 1:GGTGATGTTGGATGGGAGTGAGG;靶点 2:GGG AAGAACTTAAACCAACCAGG)。通过将寡核苷酸片段 M-*Marcks11*-E2A-gRNA_{up}:TAGGTGATGTTGGATGGGACTG 和 M-*Marcks11*-E2A-gRNA_{down}:AAACCACTCCCATCCAACATCA; M-*Marcks11*-E2B-gRNA_{up}:TAGGGAAGAACTTAAACCAACC 和 M-*Marcks11*-E2B-gRNA_{down}:AAACGGTTGGTTTAAAGTCTTC 分别退火后连接到 PUC57-gRNA 载体中,构建 sgRNA 表达载体,利用试剂盒 MEGAshortscript T7 进行体外转录获得 sgRNA。利用 PMSG 和 HCG 超排 3~4 周龄的 C57BL/6 小鼠后,与成年的雄性小鼠交配,次日从输卵管中获得受精卵。利用显微注射仪通过将 sgRNA (10 ng/ μ L), Cas9 蛋白(30 ng/ μ L)共同注射到小鼠受精卵内,随后将受精卵移植到假孕母鼠中,等待小鼠出生后进行基因型鉴定,确定靶基因是否实现敲除。

1.3.2 胚胎组织的取材

将 *Marcks11* 敲除杂合子 2 月龄雌鼠与 2 月龄雄鼠于前一天进行合笼,并于次日早晨进行阴道栓检查,如能够检测到阴道栓当天标记胚胎为 E0.5 d。

怀孕母鼠于 E15.5 d 或者 E17.5 d 时处死,解剖获得 E15.5 d 及 E17.5 d 的胚胎。分离小鼠胚胎进行称重并记录,剪取少量胚胎组织用于基因型鉴定,随后将胎肝从胚胎中小心剥离,并去除多余组织称重记录,用于后续实验。

1.3.3 小鼠基因组 DNA 提取

将 E15.5 d 小鼠或 E17.5 d 小鼠胚胎组织置于 1.5 mL EP 管中并加入 120 μ L 鼠尾裂解液,经过 55~60 $^{\circ}$ C 孵育过夜,裂解过后按照基因组提取试剂盒说明提取基因组 DNA,提取的基因组 DNA 溶于 0.1 \times TE 中,用于后期基因型鉴定。

1.3.4 小鼠的基因型鉴定

对获得的胎鼠进行基因型鉴定,用 M-*Marcks11*-WT-F/M-*Marcks11*-WT-R 引物鉴定野生型条带,片段大小 1923 bp。用 M-*Marcks11*-KO-F/M-*Marcks11*-KO-R 引物鉴定敲除条带,片段大小为 316 bp。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,29 个循环。PCR 反应结束后,用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳并成像。引物序列见表 1。将得到的电泳结果进行分析,只有野生型条带的为野生型小鼠,只有敲除条带的为敲除纯合子小鼠,两者都有的为杂合子小鼠,统计分析小鼠基因型。

1.3.4 血常规

将 E15.5 d 胚胎经断头取外周血收集于冷 PBS 中,采用全自动血液分析仪对胚胎外周血进行血液组分分析。

1.3.5 胎肝细胞流式分析

将分离获得的小鼠胎肝置于 1 mL PBS 溶液中,用 1 mL 注射器反复轻轻的抽吸吹打 3~4 次进行单细胞化,随后按照表 2 中的流式组合进行染色,流式上机进行分析。

1.3.6 小鼠胚胎 CT 扫描

将查栓获得的小鼠胚胎整体固定于 4% 多聚甲

表 1 *Marcks11* 基因敲除小鼠基因型鉴定引物
Table 1 Primers used in this study for *Marcks11* gene knockout mice genotype

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	扩增产物(bp) Amplicon
M- <i>Marcks11</i> -WT-F	TCCAGGCCCGGTGAG	1923 bp
M- <i>Marcks11</i> -WT-R	GCCTCATCTGTTCCGTTAC	
M- <i>Marcks11</i> -KO-F	TCCAGGCCCGGTGAG	316 bp
M- <i>Marcks11</i> -KO-R	TCTGTAGGTGGAGGTT GATAGC	

醛中,固定完成后使用 Micro-CT 扫描仪 (Inveon, Siemens, Berlin, 德国) 对小鼠全身进行扫描分析。CT 扫描参数设定为:电压:60 kV,电流:400 μ A,分辨率为 20 μ m。扫描结束后使用 Inveon 分析工作站进行 CT 图像重建及数据分析,计算股骨长度进行统计。

1.4 统计学方法

本文中基因型占比采用卡方检验分析,其余所涉及数据均采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 Graphpad prism7 软件进行统计学分析,并且两组间比较采用 Student's *t*-tests。当 $P < 0.05$ 时,则表示差异具有显著的统计学意义。

表 2 流式流式组合

Table 2 The antibody combination used for flow cytometry

名称 Name	组合 Combination
造血干细胞 LSK	Lin-Scal ⁺ c-Kit ⁺
长期造血干细胞 LT	Lin-Scal ⁺ c-Kit ⁺ CD34 ⁻ Flt3 ⁻
短期造血干细胞 ST	Lin-Scal ⁺ c-Kit ⁺ CD34 ⁺ Flt3 ⁻
多潜能祖细胞 MPP	Lin-Scal ⁺ c-Kit ⁺ CD34 ⁺ Flt3 ⁺

注:LT:长期造血干细胞;ST:短期造血干细胞;MPP:多潜能祖细胞。
Note, LT, Long-term hematopoietic stem cells. ST, Short-term hematopoietic stem cells. MPP, multipotent progenitor cells.

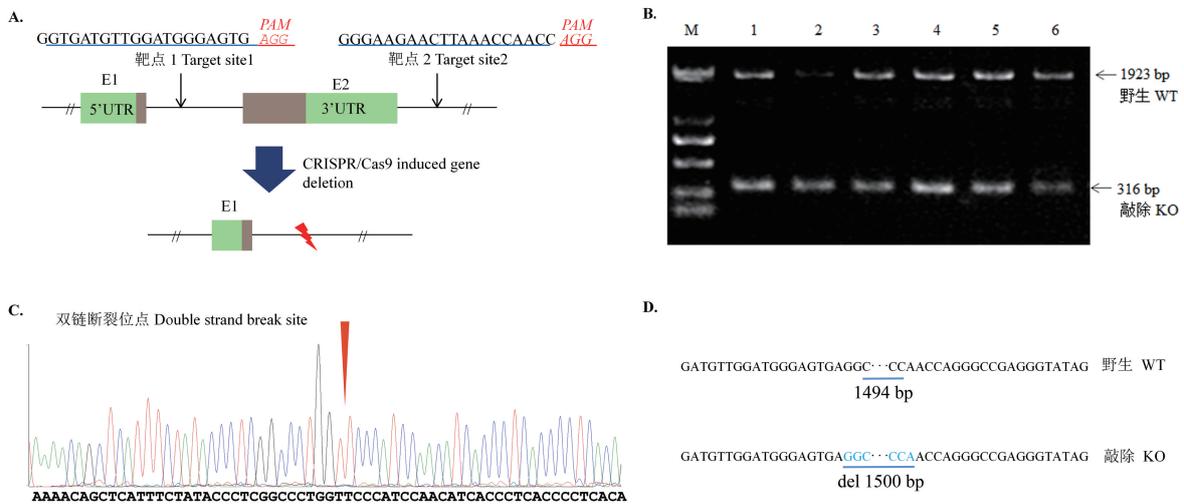
2 结果

2.1 建立 *Marcks1* 基因敲除小鼠

为研究 *Marcks1* 在造血系统中的作用,我们利用 CRISPR/Cas9 系统建立 *Marcks1* 基因敲除小鼠,构建策略如图 1A 所示。对获得的 F0 代小鼠进行基因型分析,其中 2 只 (2/5) 为基因敲除小鼠,敲除效率为 40%。随后我们对 #2 小鼠进行传代基因型和测序分析,结果显示敲除片段能够有效的传递给子代小鼠 (图 1B),并对传代小鼠基因敲除片段测序分析,敲除测序图谱如图 1C 所示,通过与参考序列比对分析,结果显示敲除片段大小为 1500 bp 图 1D 所示。综上,我们成功在小鼠基因组中敲除了 *Marcks1* 基因的第二外显子,并能稳定传代。

2.2 *Marcks1* 基因缺失导致小鼠胚胎致死

在 *Marcks1* 基因敲除小鼠繁殖过程中,未获得纯合敲除小鼠,通过对胚胎期小鼠基因型检测,发现该基因缺失会造成小鼠颅骨发育缺陷,导致小鼠胚胎致死 (图 2A),这与之前的报道一致^[18]。随后我们分析了 E15.5 d 和 E17.5 d 的小鼠胚胎,统计 *Marcks1* 基因敲除小鼠的占比。对 59 只胎鼠的基



注:A:利用 CRISPR/Cas9 系统建立 *Marcks1* 基因敲除小鼠构建策略,靶点 1 及靶点 2 为 sgRNA 对应的靶点位置;B:*Marcks1* 基因敲除小鼠 #2 的传代基因型鉴定电泳图 (M:Marker, DL2000;1-6:分别代表父代 #2 小鼠;子代小鼠 1-5。图中所示均为杂合子,野生条带大小为 1923 bp,敲除条带大小为 316 bp);C:*Marcks1* 敲除片段的测序结果图;D:*Marcks1* 基因位置 DNA 序列信息和基因敲除小鼠缺失片段信息。

图 1 建立 *Marcks1* 基因敲除小鼠

Note. A, Schematic overview of CRISPR/Cas9 system mediated *Marcks1* gene knockout in mice, targeting site1 and site2 are the sgRNA target sites. B, Germline transmission of *Marcks1* gene knockout mice (#2). (All the F1 mice produced from founder #2 were heterozygous. M, Marker, DL2000. 1-6, Founder #2, and F1 generation number #1-#5. Wild type band was 1923 bp and the knockout band was 316 bp); C, The chromatographs from sequences of truncated PCR products; D, The sequences results of truncated PCR products. The deleted DNA fragments of *Marcks1* were shown.

Figure 1 Establishment of *Marcks1* knockout mice

因型分析,发现 E17.5 d 纯合子小鼠的占比显著低于 E15.5 d 纯合子的比例,敲除小鼠在 E15.5 d 时占比 40%,而在 E17.5 d 时比例不足 10%(表 3)。对 E15.5 d 和 E17.5 基因型占比进行卡方检验分析(χ^2 值为 28.225, P 值为 7.432×10^{-7}),发现存在统计学差异,表明 *Marcks11* 基因缺失造成的死亡发生在胚胎发育后期。随后对胚胎 E17.5 d 小鼠进行 CT 扫描分析,发现 *Marcks11* 基因敲除会导致小鼠骨骼发育异常(图 2B)。通过对小鼠的股骨长度进行统计分析,结果显示敲除小鼠的股骨长度与野生型相比较短(图 2C)。

2.3 *Marcks11* 基因缺失不影响胚胎血细胞数量和比例

前期工作中,通过 RNA-seq 数据分析,发现该基因在小鼠的造血干细胞中高表达,并在老年小鼠中表达显著升高,为研究该基因在造血干细胞中的作用,我们分析了基因敲除后胎肝的发育情况。通过对 E15.5 d 小鼠胎肝称重,发现 *Marcks11* 敲除小鼠胎肝重(图 3A)以及肝重体重比(图 3B)与野生组相比无明显差异。同时我们对 E15.5 d 小鼠的外周血进行血常规分析(图 3C),结果显示敲除小鼠组的红细胞,白细胞与血小板的占比与野生组相比无明显差异。

2.4 *Marcks11* 敲除促进胎肝中造血干细胞增殖

为了研究 *Marcks11* 的缺失对造血干细胞的影响。我们通过流式细胞术对 E15.5d 的小鼠进行胎肝 KSL 细胞($\text{Lin}^-/\text{Sca1}^+/\text{c-Kit}^+$ cell)占比分析,结果显示 *Marcks11* 基因敲除小鼠胎肝中的造血干细胞显著高于对照组中(图 4A, 4B),进一步对造血干细

胞进行分类发现与野生组相比敲除小鼠的长期造血干细胞(Long-term hematopoietic stem cell, LT)占比较高(图 4C, 4D)。这些结果表明 *Marcks11* 缺失能够导致造血干细胞数量增加。

3 讨论

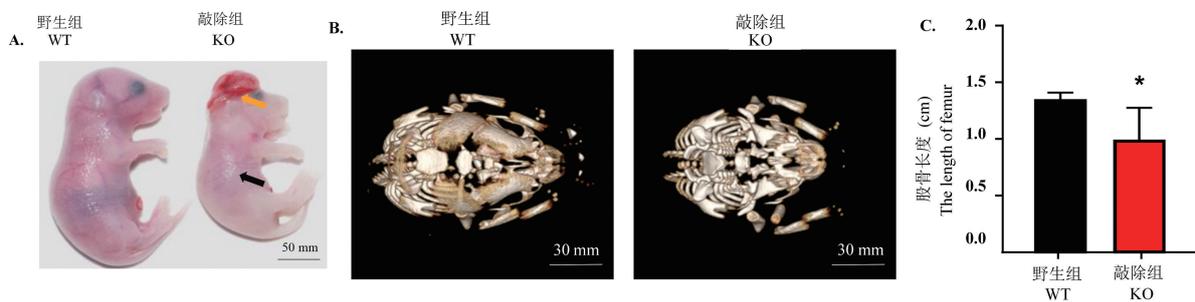
MARCKSL1 在多种组织中表达^[11],参与整联蛋白活化,细胞粘附,细胞迁移,吞噬作用,血管生成和脑发育的调控^[12,19-21]。MARCKSL1 最初被发现于巨噬细胞中高表达,且调节巨噬细胞的功能。MARCKSL1 能够被 PKC 磷酸化,结合肌动蛋白影响胞质移位,进而调节巨噬细胞的吞噬^[22]。MARCKSL1 还在免疫系统中发挥重要的调节作用,包括促进炎症细胞的迁移以及细胞因子的分泌。前期工作中,我们发现 *Marcks11* 基因在造血干细胞中高表达,并且在老年小鼠的造血干细胞表达显著升高,提示 MARCKSL1 可能在造血干细胞衰老中发挥重要作用,但是关于 MARCKSL1 在造血系统中的功能仍不清楚。本研究中,通过 CRISPR/Cas9 系统

表 3 E15.5 d 以及 E17.5 d 中不同基因型胚胎的数量以及占总胚胎数的比例

Genotype 基因型	E15.5	E17.5
WT	11 (32%)	11 (46%)
HET	10 (28%)	11 (46%)
HOM	14 (40%)	2 (8%)
Total	35	24

注:WT;野生型;HET;杂合子;HOM;纯合子。

Note. WT, Wild type. HET, Heterozygote. HOM, Homozygous.

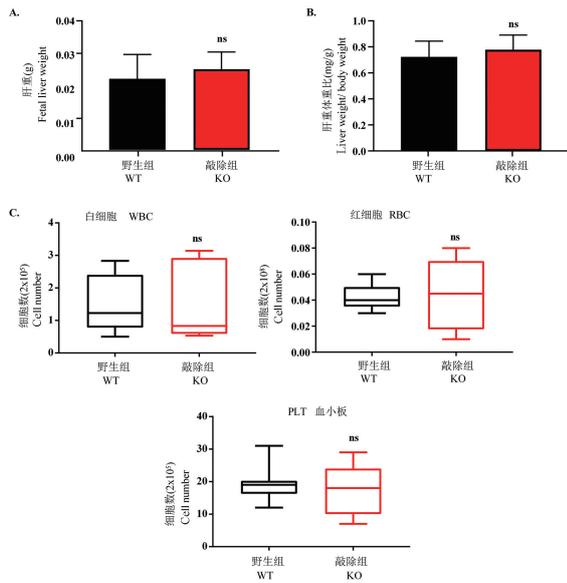


注:A;E15.5 天野生型和 *Marcks11* 基因敲除小鼠形态对比图;B;CT 扫描野生型和 *Marcks11* 基因敲除小鼠颅骨图像;C:CT 扫描野生型和 *Marcks11* 基因敲除小鼠股骨长度;与野生组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图 2 *Marcks11* 基因缺失对小鼠发育的影响($n \geq 5$)

Note. A, The picture of E15.5 WT and *Marcks11*-knockout mouse. B, The skull images of WT and *Marcks11* gene knockout mice scanned by CT. C, The femur length of WT and *Marcks11* gene knockout mice scanned by CT. Compared with wild type, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 The function of *Marcks11* gene deletion on mouse development



注:A: E15.5 d 小鼠胎肝重量;B: E15.5 d 小鼠胎肝体重占比;C: E15.5 d 小鼠外周血常规结果(依次为白细胞,红细胞,血小板) ns:统计无显著性。

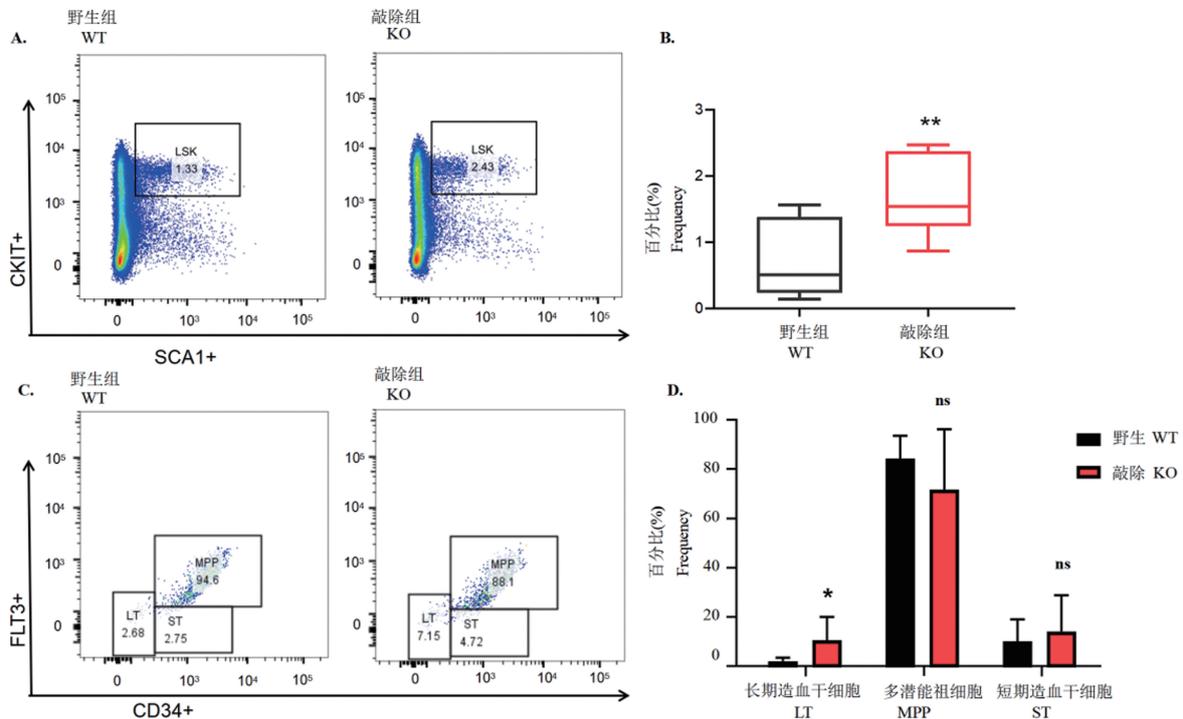
图3 *Marcks11* 基因敲除小鼠肝发育和血细胞占比分析($n \geq 5$)

Note. A, The weight of E15.5 fetal liver. B, Quantitative analysis of the ratio of liver weight to body weight. C, The results of E15.5 Peripheral blood routine (WBC, White blood cells, RBC, Red blood cells, PLT, Platelets). ns, Not significant.

Figure 3 Analysis the liver development and blood cell ratio in *Marcks11* gene knockout mice

建立了该基因的敲除小鼠,发现敲除 *Marcks11* 基因导致的死亡发生于胚胎发育后期。随后,取胚胎小鼠的外周血进行血常规检测,结果显示与对照组相比,*Marcks11* 基因敲除小鼠的白细胞,红细胞以及血小板的数量没有明显的变化。并且通过流式细胞术对 E15.5 d 胚胎小鼠的胎肝细胞进行染色分析,表明 MARCKSL1 缺失导致胎肝中造血干细胞数量增多。

MARCKSL1 主要定位于细胞质侧膜上,通过与 PIP2 作用,可以控制 PIP2 的水解,PIP2 被 PLC (phospholipase C) 选择性水解,产生三磷酸肌醇 (IP3) 和 DAG (diacylglycerol),也可以被 PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 磷酸化,生成 PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate)。因此, MARCKSL1 的磷酸化状态影响了细胞信号通路效应因子,包括磷脂酶 D (PLD) 和磷酸肌醇激酶 3 (PI3K),后者通过 PIP2 磷酸化到 PIP3 激活 AKT 信号从而调控下游信号分子^[23]。Liang 等^[24] 发现 MARCKSL1 通过调节 AKT / SNAI2 通路促进肺腺癌细胞的细胞增殖,迁移和侵袭。此外, MARCKSL1 在 PI3K/AKT 等信号通路的调节中发



注:A: E15.5 d 胎肝 KSL 细胞流式分析;B: E15.5d 胎肝中 KSL 细胞的比例;C: E15.5d 胎肝中长期造血干细胞,短期造血干细胞,多潜能祖细胞流式分析;D: E15.5d 胎肝中长期造血干细胞,短期造血干细胞,多潜能祖细胞比例。与野生组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 *Marcks11* 基因敲除对胎肝中造血干细胞的影响 ($n \geq 5$)

Note. A, Analysis of the E15.5 fetal liver KSL cell by flow cytometry analysis. B, The proportion of KSL cell in E15.5 fetal liver. C, The flow cytometry result of LT(long-term hematopoietic stem cells), ST(short-term hematopoietic stem cells), and MPP(multipotent progenitor cells) from E15.5 fetal liver. D, The proportion of LT, ST, and MPP in E15.5 fetal liver. Compared with wild type, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of *Marcks11* gene knockout on hematopoietic stem cell

挥了重要作用,并在肝癌、乳腺癌,肺癌中高表达,调节肿瘤细胞的增殖、凋亡以及迁移。免疫系统调控与造血系统密不可分,造血干细胞功能的变化直接影响免疫应答过程。本研究通过建立 *Marcks1* 基因敲除小鼠,初步证明了该基因缺失会影响造血干细胞数量,但是 *Marcks1* 如何调节造血干细胞发育和造血稳态平衡仍需进一步研究。通过本研究,我们成功建立了 *Marcks1* 基因敲除小鼠,为研究 MARCKSL1 在造血干细胞和胚胎发育的功能提供了动物模型支持。

参考文献:

- [1] Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region [J]. Cell, 1996, 86(6): 897-906.
- [2] Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions [J]. Development, 2011, 138(6): 1017-1031.
- [3] Morita Y, Iseki A, Okamura S, et al. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen [J]. Exp Hematol, 2011, 39(3): 351-359.
- [4] Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, et al. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells [J]. PLoS Biol, 2004, 2(3): E75.
- [5] Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(2): 770-774.
- [6] Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, et al. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice [J]. Development, 1995, 121(6): 1845-1854.
- [7] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter [J]. Nature, 2009, 457(7231): 887-891.
- [8] de Pater E, Kaimakis P, Vink CS, et al. Gata2 is required for HSC generation and survival [J]. J Exp Med, 2013, 210(13): 2843-2850.
- [9] Undi RB, Gutti U, Sahu I, et al. Wnt Signaling: Role in Regulation of Haematopoiesis [J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2016, 32(2): 123-134.
- [10] Stumpo DJ, Eddy RJ, Haley LL, et al. Promoter sequence, expression, and fine chromosomal mapping of the human gene (MLP) encoding the MARCKS-like protein: identification of neighboring and linked polymorphic loci for MLP and MACS and use in the evaluation of human neural tube defects [J]. Genomics, 1998, 49(2): 253-264.
- [11] El AM, Fitzgerald U, Schlosser G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 43.
- [12] Li J, Aderem A. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates [J]. Cell, 1992, 70(5): 791-801.
- [13] Jahan KS, Shi J, Greenberg H, et al. MARCKS mediates vascular contractility through regulating interactions between voltage-gated Ca²⁺ channels and PIP2 [J]. Vascul Pharmacol, 2020, 132: 106776.
- [14] Park J, Fang S, Crews AL, et al. MARCKS regulation of mucin secretion by airway epithelium in vitro: interaction with chaperones [J]. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008, 39(1): 68-76.
- [15] Iioka H, Ueno N, Kinoshita N. Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements [J]. J Cell Biol, 2004, 164(2): 169-174.
- [16] Björkblom B, Padzik A, Mohammad H, et al. c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(17): 3513-3526.
- [17] Chen J, Chang S, Duncan SA, et al. Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(13): 6275-6279.
- [18] Stumpo DJ, Bock CB, Tuttle JS, et al. MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(4): 944-948.
- [19] Eckert RE, Neuder LE, Park J, et al. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 42(5): 586-594.
- [20] Kalwa H, Michel T. The MARCKS protein plays a critical role in phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate metabolism and directed cell movement in vascular endothelial cells [J]. J Biol Chem. 2011, 286(3): 2320-2330.
- [21] Brudvig JJ, Weimer JM. X MARCKS the spot: myristoylated alanine-rich C kinase substrate in neuronal function and disease [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 407.
- [22] Chun KR, Bae EM, Kim JK, et al. Suppression of the lipopolysaccharide-induced expression of MARCKS-related protein (MRP) affects transmigration in activated RAW264.7 cells [J]. Cell Immunol, 2009, 256(1-2): 92-98.
- [23] Gambhir A, Hangyas-Mihalyne G, Zaitseva I, et al. Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins [J]. Biophys J, 2004, 86(4): 2188-2207.
- [24] Liang W, Gao R, Yang M, et al. MARCKSL1 promotes the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells [J]. Oncol Lett, 2020, 19(3): 2272-2280.

[收稿日期] 2020-03-01